

PENINGKATAN PEMBENTUKAN KALUS JAMBU METE PADA KULTUR IN VITRO DARI EKSPLAN DAUN DAN MAHKOTA BUNGA

Nur Ajijah, Indah Sulistiyorini dan Rossa Yunita

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri

Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357

balittri@gmail.com

(Diajukan tanggal 16 Maret 2011, diterima tanggal 1 Juni 2011)

ABSTRAK

Peningkatan persentase pembentukan kalus jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dari eksplan daun dan mahkota bunga telah berhasil dilakukan melalui penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D, pokloram dan BA. Pada eksplan daun rata-rata persentase pembentukan kalus paling tinggi diperoleh pada perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l dan 2,4-D 5 mg/l + pikloram 0.5 mg/l dengan persentase pembentukan kalus 33.3%. Pada penggunaan eksplan mahkota bunga rata-rata persentase pembentukan kalus paling tinggi diperoleh pada perlakuan 2,4-D 10 mg/l sebesar 40%. Kalus yang terbentuk berwarna coklat kehitaman yang mengindikasikan penggunaan PVP 200 mg/l masih belum dapat mengatasi masalah oksidasi fenol.

Kata Kunci : *Anacardium occidentale* L., kalus, daun, mahkota bunga.

ABSTRACT

Improvement of callus formation of cashew in vitro culture from leaf and flower petal explants. The increasing of the callus formation of cashew (Anacardium occidentale L.) from leaf explants and the petals have successfully done through the use of a combination of plant growth regulators 2,4-D, pocloram and BA. On leaf explants the highest percentage of callus formation was obtained in combination treatment of plant growth regulators 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l and 2,4-D 5 mg/l + picloram 0.5 mg/l with callus formation percentage of 33.3%. On the use of petal explants the highest percentage of callus formation was obtained on 2,4-D treatment of 10 mg/l with callus formation percentage of 40%. Formed callus were blackish brown demonstrate the use of PVP 200 mg/l still can not overcome the problem of phenol oxidation.

Keywords : *Anacardium occidentale* L., callus, leaves, petals.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam pengembangan jambu mete adalah tidak tersedianya benih varietas unggul dalam jumlah yang memadai untuk penanaman dalam skala besar (Martin, 2003). Perbanyakkan jambu mete dengan biji sering kali menghasilkan benih dengan tingkat keragaman genetik yang tinggi disebabkan sifat menyerbuk silang yang dimiliki tanaman jambu mete (Philip dan Uni, 1984 dalam Aliyu, 2005). Disamping itu perbanyakkan dengan biji juga seringkali mengakibatkan sifat-sifat unggul dari suatu varietas yang dikontrol oleh gen aditif sebagai hasil dari upaya pemuliaan menjadi mudah hilang disebabkan

oleh adanya segregasi. Upaya perbanyakkan vegetatif jambu mete secara konvensional melalui penyambungan, setek dan *air layering* belum memberikan hasil yang memadai karena laju multiplikasinya rendah sehingga tidak dapat menyediakan benih varietas unggul secara cepat dalam jumlah yang memadai (Cardoza dan D'Sauza, 2002; Martin, 2003).

Salah satu metode yang dapat ditempuh untuk perbanyakkan tanaman secara cepat dan *true to type* adalah perbanyakkan kultur jaringan melalui embriogenesis somatik. Keuntungan penggunaan embrio somatik dalam perbanyakkan tanaman secara masal adalah laju multiplikasi tinggi, memungkinkan untuk menggunakan media cair dan

bioreaktor dan dapat dihasilkan sejumlah besar embrio dalam satu kali produksi (Hamidah *et al.*, 1997 dalam Husein *et al.*, 2006). Lebih jauh dilaporkan bahwa tanaman yang dihasilkan melalui embriogenesis somatik adalah *true to type* (Martin, 2003) karena variasi somaklonal pada embriogenesis somatik secara langsung lebih rendah (Vicient dan Martinez, 1998). Kelebihan lainnya adalah benih yang dihasilkan melalui embriogenesis somatik akan memiliki akar tunggang seperti yang terbentuk dari biji sehingga tanaman jambu mete yang dihasilkan diharapkan akan memiliki perakaran yang kokoh dan dalam.

Embriogenesis somatik merupakan proses regenerasi yang terdiri dari multistep dimulai dengan pembentukan masa kalus embriogenik (Afreen dan Zobayed, 2005). Zat pengatur tumbuh berperan penting dalam perubahan kompetensi sel somatik menjadi sel yang bersifat embriogenik. Pada tanaman monokotiledon zat pengatur tumbuh yang berperan umumnya auksin sedangkan pada tanaman dikotiledon zat pengatur tumbuh yang diperlukan sangat bervariasi (Jimenez, 2001). Beberapa peneliti telah melaporkan keberhasilan induksi embrio somatik pada tanaman jambu mete dengan menggunakan eksplan nuselus (Ananthakrishnan *et al.*, 1999; Cardoza dan D'Sauza, 2002; Anil dan Thimmappaiah, 2005), embrio zigotik (Gogate dan Nadgauda, 2003) dan selaput biji (Martin, 2003), namun belum dilaporkan pembentukan embriosomatik jambu mete dari eksplan daun dan bunga. Zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus embriogenik adalah 2,4-D (Anil dan Thimmappaiah, 2005), 2,4-D dan picloram (Cardoza dan D'Sauza, 2002). Sedangkan Martin (2003) berhasil melakukan induksi embriogenesis somatik jambu mete secara langsung dari eksplan selaput biji dengan pada media MS dengan penambahan BA, adenin sulfat dan NAA dengan rata-rata 3.3 embrio per eksplan. Ajijah dan Randriani (2009) telah berhasil melakukan inisiasi pembentukan kalus jambu mete dari eksplan daun dan mahkota bunga dengan menggunakan zat pengatur tumbuh 2,4-D namun dengan tingkat keberhasilan yang masih rendah sekitar 3% dan penampilan kalus yang berwarna coklat kehitaman akibat adanya oksidasi fenol. Menurut Aliyu (2005) sejauh ini protokol untuk produksi embrio somatik

secara masal pada tanaman jambu mete belum tersedia.

Penelitian bertujuan untuk meningkatkan persentase pembentukan kalus varietas unggul jambu mete dari eksplan daun dan mahkota bunga melalui penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh auksin (2,4-D dan picloram) dan sitokinin (BA) dan mengatasi masalah oksidasi fenol menggunakan PVP (polyvinyl pirolidon).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Lab. Kultur Jaringan Balittri, Parungkuda-Sukabumi dan KP. Cikampek mulai Januari – Desember 2010.

Eksplan yang digunakan adalah daun muda dan mahkota bunga (petal) dari kuncup bunga varietas unggul jambu mete BO-2.

Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan air mengalir, direndam larutan deterjen 2% selama 15-30 menit, lalu direndam fungisida dan bakterisida selama 30-40 menit kemudian dicuci aquades steril. Eksplan dibawa ke dalam laminar kemudian direndam dalam larutan pemutih komersial 20% selama 20 menit, larutan pemutih komersial 10% selama 10 menit, terakhir dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali (Ajijah dan Randriani, 2009).

Induksi Kalus

Induksi kalus dilakukan pada media MS yang diperkaya dengan 400 mg/l glutamin, 100 mg/l L-cystein-HCl, PVP 200 mg/l, sukrosa 3% (w/v), zat pengatur tumbuh 2,4-D (0, 5, 10 dan 15 mg/l) yang dikombinasikan dengan BA atau picloram (0, 0.5 dan 1 mg/l), sebagai pematid digunakan agar 0.8% (w/v), pH media diatur 5.8 sebelum dimasukkan ke dalam autoclav. Setiap botol kultur diisi 25 ml media. Induksi kalus dilakukan melalui 2 seri perlakuan. Pada seri pertama digunakan eksplan daun muda dan pada seri ke dua digunakan eksplan mahkota bunga. Kultur diinkubasi pada suhu 20-25°C dalam kondisi gelap sampai terbentuk kalus. Untuk mengatasi masalah oksidasi fenol ke dalam media ditambahkan polyvinyl pirolidon 200 mg/l.

Penelitian disusun dalam rancangan lingkungan Acak Lengkap dengan 10 ulangan.

Setiap ulangan terdiri dari 1 botol dan setiap botol terdiri dari 3 eksplan untuk seri pertama dan 5 eksplan untuk seri ke dua.

Parameter yang diamati meliputi persentase terbentuknya kalus, warna kalus, morfologi serta tahap perkembangan kalus. Pengamatan dilakukan 1 minggu sekali mulai 1-12 minggu setelah tanam (MST).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penggunaan Eksplan daun Muda

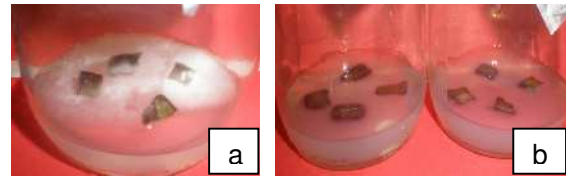
Pada penelitian seri pertama ini kendala utama yang dihadapi adalah tingginya tingkat kontaminasi yang diakibatkan oleh fungi. Metode sterilisasi yang telah diperoleh sebelumnya (Ajijah dan Randriani, 2009) tidak memberikan hasil yang baik pada penelitian ini yaitu tingkat kontaminasi masih tetap tinggi sekitar 80-90% (Gambar 2a). Tingginya tingkat kontaminasi merupakan salah satu kendala pada kultur jaringan jambu mete, disamping oksidasi fenol dan tanaman yang bersifat rekalsitran (Aliyu, 2005). Pada penelitian ini pengambilan eksplan dari lapang dilakukan pada saat musim hujan dimana tingkat kelembaban udara yang tinggi saat musim hujan mengakibatkan tingginya tingkat infeksi fungi di lapang antara lain *Botryodiplodia* sp. yang menyebabkan penyakit layu pucuk (Gambar 1 a-b). Penyakit ini banyak menyerang tanaman jambu mete terutama saat kelembaban udara tinggi.



Gambar 1. Tanaman jambu mete di lapang yang mengalami layu pucuk akibat serangan *Botryodiplodia* sp. Daun muda yang mengalami layu (a), pada tingkat serangan lebih lanjut keseluruhan pucuk mengering dan mati (b).

Figure 1. Cashew trees in a field that had withered shoots due to attack of *Botryodiplodia* sp. Young leaves have wilted (a), the overall level of further attacks shoots dry up and die (b).

Kendala akibat tingginya tingkat kontaminasi telah diupayakan diatasi dengan cara melakukan pemeliharaan secara intensif benih jambu mete asal penyambungan di rumah kaca yang akan digunakan sebagai sumber eksplan, penyemprotan tanaman sumber eksplan dengan fungisida, menambah dosis sterilan dan dengan pembakaran (melewatkan eksplan di atas api bunsen). Penambahan dosis sterilan klorox (pemutih komersial) sampai 30% tidak memberikan hasil yang baik dimana tingkat kontaminasi masih tetap tinggi (Gambar 2a), namun pembakaran mampu menekan tingkat kontaminasi sampai 30% (Gambar 2b). Dengan perbaikan metode sterilisasi tersebut telah diperoleh eksplan daun steril sehingga dapat dilakukan penanaman pada media perlakuan untuk induksi kalus.

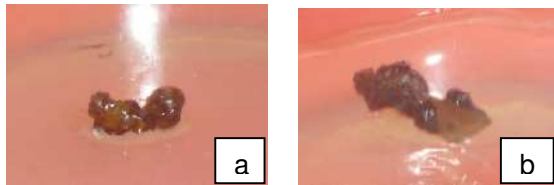


Gambar 2. Persiapan eksplan potongan daun steril. Kultur yang mengalami kontaminasi pada perlakuan klorox 30% (a) dan kultur yang tidak terkontaminasi (kontaminasi minimal) pada perlakuan eksplan dilewatkan di atas api bunsen (b).

Figure 2. Preparation of pieces sterile leaf explants. Cultures that had contamination on klorox 30% treatment (a) and the culture that is not contaminated (minimal contamination) in explants treatment which passed over Bunsen burner (b).

Penggunaan eksplan daun kalus hanya terbentuk pada perlakuan 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l dan 2,4-D 5 mg/l + pikloram 0.5 mg/l dengan persentase pembentukan kalus 33.3% (Tabel 1). Penggunaan 2,4-D konsentrasi tinggi (10 dan 15 mg/l) tidak menghasilkan kalus, demikian juga dengan kombinasi perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi BA dan pikloram lainnya. Kalus yang terbentuk pada perlakuan 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l dan 2,4-D 5 mg/l + pikloram 0.5 mg/l berwarna kecoklatan dengan struktur yang kompak (Gambar 3a). Warna kalus yang coklat mengindikasikan adanya tingkat oksidasi fenol yang tinggi. Oksidasi fenol menghasilkan senyawa organik quinon yang menghasilkan warna coklat (Barbehen *et al.*, 2007). Menurut Laukkanen *et al.* (1999) dalam Ozyigit *et al.*, (2007) senyawa fenol

yang teroksidasi dapat menghambat aktivitas enzim dan menghasilkan warna gelap pada media kultur dan menyebabkan kematian pada eksplan. Menurut Arnaldos *et al.* (2001) secara umum oksidasi fenol memberikan pengaruh negatif terhadap proliferasi sel.



Gambar 3. Kalus yang terbentuk dari eksplan potongan daun muda pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l (a) dan 2,4-D 5 mg/l + pikloram 0.5 mg/l (b) dan PVP 200 mg/l.

Figure 3. Callus formed from pieces of young leaf explants on MS medium with the addition of plant growth regulators 2,4-D 5 mg / l BA + 1 mg / l (a) and 2,4-D 5 mg / l + pikloram 0.5 mg / l (b) and PVP 200 mg / l.

Penggunaan 2,4-D 5 mg/l yang dikombinasikan dengan BA 1 mg/l dan pikloram 0.5 mg/l mampu meningkatkan persentase pembentukan kalus dibandingkan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kalus jambu mete dapat diinduksi dari eksplan daun muda pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l, namun pertumbuhan kalus sangat lambat dan persentase pembentukan kalus

masih rendah yaitu sekitar 3% (Ajjiah dan Randriani, 2009).

Penambahan antioksidan PVP 200 mg/l ke dalam media belum mampu memperbaiki tampilan kalus dari eksplan daun, kalus yang terbentuk masih berwarna coklat kehitaman yang menunjukkan masih adanya oksidasi fenol pada kultur kalus. Penggunaan antioksidan lain seperti asam ascorbat, arang aktif, DIECA dan beberapa asam amino kemungkinan diperlukan untuk mengatasi kendala oksidasi fenol ini. Menurut Toth *et al.* (1994) dalam Ozyigit *et al.* (2007), antioksidan dapat mengurangi oksidasi fenol dan berperan dalam mendorong regenerasi eksplan.

Penggunaan Eksplan Petal

Pada penelitian kedua, kalus berhasil terbentuk baik pada perlakuan auksin 2,4-D secara tunggal maupun 2,4-D ditambah picloram serta kombinasi 2,4-D dengan BA (sitokinin). Pada perlakuan auksin secara tunggal tanpa penambahan sitokinin kalus terbentuk pada konsentrasi 2,4-D yang tinggi yaitu 10 dan 15 mg/l serta 2,4-D 5 mg/l dan 15 mg/l yang diperkuat dengan penambahan picloram 0.5 mg/l. Pada perlakuan auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin kalus dapat terbentuk pada konsentrasi 2,4-D yang lebih rendah yaitu 5 mg/l yang dikombinasikan dengan BA 0.5 dan 1 mg/l.

Tabel 1. Persentase pembentukan kalus jambu mete dari eksplan daun muda pada masing-masing perlakuan zat pengatur tumbuh

Table 1. Percentage of callus formed from young leaf explant on each treatment

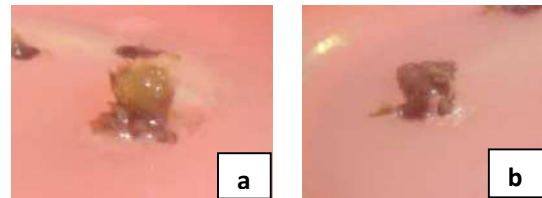
No.	Kombinasi perlakuan zat pengatur tumbuh (mg/l)	Pembentukan kalus (%)	Penampilan kalus
1	2,4-D 0	0	
2	2,4-D 5	0	
3	2,4-D 10	0	
4	2,4-D 15	0	
5	2,4-D 0 + picloram 0.5	0	
6	2,4-D 5 + picloram 0.5	33.3	Coklat kehitaman
7	2,4-D 10 + picloram 0.5	0	
8	2,4-D 15 + picloram 0.5	0	
9	2,4-D 0 + picloram 1.0	0	
10	2,4-D 5 + picloram 1.0	0	
11	2,4-D 10 + picloram 1.0	0	
12	2,4-D 15 + picloram 1.0	0	
13	2,4-D 0 + BA 0.5	0	
14	2,4-D 5 + BA 0.5	0	
15	2,4-D 10 + BA 0.5	0	
16	2,4-D 15 + BA 0.5	0	
17	2,4-D 0 + BA 1.0	0	
18	2,4-D 5 + BA 1.0	33.3	Coklat kehitaman
19	2,4-D 10 + BA 1.0	0	
20	2,4-D 15 + BA 1.0	0	

Tabel 2. Persentase pembentukan kalus jambu mete dari eksplan petal kuncup bunga pada masing-masing perlakuan zat pengatur tumbuh
 Table 2. Percentage of callus formation from explants of cashew petal flower buds on each of the treatment of plant growth regulators

No.	Kombinasi Perlakuan Zat Pengatur Tumbuh (mg/l)	Pembentukan kalus (%)	Penampilan Kalus
1	2,4-D 0	0	
2	2,4-D 5	0	
3	2,4-D 10	40	Kalus kehitaman
4	2,4-D 15	24.29	Kalus coklat kehitaman
5	2,4-D 0 + picloram 0.5	0	
6	2,4-D 5 + picloram 0.5	0	
7	2,4-D 10 + picloram 0.5	0	
8	2,4-D 15 + picloram 0.5	20	Kalus coklat kehitaman
9	2,4-D 0 + picloram 1.0	0	
10	2,4-D 5 + picloram 1.0	20	Kalus coklat kehitaman
11	2,4-D 10 + picloram 1.0	0	
12	2,4-D 15 + picloram 1.0	0	
13	2,4-D 0 + BA 0.5	0	
14	2,4-D 5 + BA 0.5	20	Kalus coklat kehitaman
15	2,4-D 10 + BA 0.5	0	
16	2,4-D 15 + BA 0.5	0	
17	2,4-D 0 + BA 1.0	0	
18	2,4-D 5 + BA 1.0	20	Kalus coklat kehitaman
19	2,4-D 10 + BA 1.0	0	
20	2,4-D 15 + BA 1.0	0	

Penggunaan 2,4-D pada konsentrasi tinggi akan menginduksi variasi genetik yang lebih tinggi, sehingga penggunaan pada konsentrasi rendah lebih diharapkan. Persentase pembentukan kalus pada masing-masing perlakuan berkisar antara 0-40%, dengan persentase tertinggi terdapat pada perlakuan 2,4-D 10 mg/l (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan adanya peningkatan persentase keberhasilan pembentukan kalus dari eksplan petal dibandingkan penelitian sebelumnya. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan keberhasilan induksi kalus jambu mete dari eksplan petal kuncup bunga pada media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/l dengan persentase pembentukan kalus sekitar 3% (Ajijah dan Randriani, 2009).

Pada penelitian ini penggunaan antioksidan PVP 200 mg/l di dalam media juga belum mampu mengatasi masalah oksidasi fenol. Kalus yang terbentuk masih berwarna coklat muda sampai coklat kehitaman (Gambar 4a dan 4b).



Gambar 4. Kalus yang terbentuk dari eksplan petal kuncup bunga pada perlakuan media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 15 mg/l (a) dan 2,4-D 5 mg/l + BA 0.5 mg/l (b).

Figure 4. Callus formed from petal flower bud explants on MS media treatment with the addition of plant growth regulators 2,4-D 15 mg / l (a) and 2,4-D 5 mg / l BA + 0.5 mg / l (b).

Pada penggunaan eksplan petal dari kuncup bunga, kontaminasi relatif tidak menjadi masalah. Hal ini diduga disebabkan bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah bagian petal (mahkota) yang terletak pada bagian dalam kuncup bunga dan masih terbungkus sepal (kelopak) sehingga relatif lebih steril.

KESIMPULAN DAN SARAN

Tingkat kontaminasi yang tinggi merupakan kendala utama dalam penelitian induksi kalus embriogenik jambu mete dengan menggunakan eksplan daun dari lapang. Tingkat kontaminasi pada penggunaan eksplan bunga lebih rendah dibandingkan pada penggunaan eksplan daun.

Kalus dapat diinduksi baik dari eksplan daun maupun eksplan mahkota bunga. Pada penggunaan eksplan daun muda kalus dapat diinduksi pada perlakuan 2,4-D 5 mg/l + BA 1 mg/l dan 2,4-D 5 mg/l + pikloram 0.5 mg/l dengan tingkat pembentukan kalus 33.3%. Pada penggunaan eksplan mahkota bunga kalus dapat diinduksi pada perlakuan 2,4-D 10 dan 15 mg/l, 2,4-D 5 mg/l dan 15 mg/l + picloram 0.5 mg/l serta 2,4-D 5 mg/l + BA 0.5 dan 1 mg/l dengan tingkat pembentukan kalus berkisar antara 20-40%.

DAFTAR PUSTAKA

- Afreen, F., and S.M.A. Zobayed. 2005. Photoautotrophic plant conversion in the process of somatic embryogenesis. In: T. Kozai, E. Afreen and S.M.A. Zobayed (eds.) : *Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Propagation and Transplant Production System*. P. 91-122.
- Ajijah, N., dan Randiani, E. 2009. Induksi kalus varietas unggul jambu mete (*Anacardium occidentale* L.) dari eksplan bunga dan daun. Laporan Kegiatan Penelitian SINTA 2009. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri.
- Aliyu, M.O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding : An appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4 (13) : 1485-1489.
- Ananthkrishnan, G., Ravikumar, R., Prem Anand, R., Vengadesan, G., and Ganapathi, A. 1999. Induction of somatic embryogenesis from nucellus-derived callus of *Anacardium occidentale* L. *Scientia Horticulturae* 79: 91-99
- Anil, S.R., and Thimmappaiah. 2005. Somatic embryogenesis from nucellar callus of cashew. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 80 (3): 327-331
- Arnaldos TL., Munoz R, Ferrer MA, and Calderon AA. 2001. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiol. Plant.* 113: 315-322
- Barbehenn, R.V. C. P. Jones, L.Y.L. Tran, and C.P. Constabel. 2007. Limited impact of elevated levels of polyphenol oxidase on tree-feeding caterpillars: assessing individual plant defenses with transgenic poplar. *Oecologia* 154:129-140
- Cardoza, V., and D'Sauza, L. 2002. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae* 93: 367-372
- Jimenez, V.M. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13(2):196-223.
- Gogate, S.S., and R.S. Nadgauda. 2003. Direct induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae* 97: 75-82.
- Hussein, S., R. Ibrahim, and A.L.P. Kiong. 2006. Somatic embryogenesis : an alternatif method in vitro micropropagation. *Iranian J. Biotech* 4 (3): 156-161.
- Martin, K.P. 2003. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explant of cashew (*Anacardium occidentale* L.), *Scientia Horticulturae* 98 (3): 299-304.
- Ozyigit I., L., M.V. Kahraman, and O. Ercan. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6 (1) : 003-008.
- Vicient, C.M., and Martinez, F.X. 1998. The potensial use of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 10(1):1-12.